

ハムスター実験膀胱癌における肝転移抑制に関する研究

著者	加藤 宣誠
号	1981
発行年	1988
URL	http://hdl.handle.net/10097/20153

氏 名（本籍）
か とう すみ とも
加 藤 宣 誠

学 位 の 種 類
医 学 博 士

学 位 記 番 号
医 第 1 9 8 1 号

学位授与年月日
昭 和 63 年 2 月 24 日

学位授与の要件
学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴
昭 和 56 年 3 月
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目
ハムスター実験肺癌における肝転移抑制に関する研究

（主 査）

論 文 審 査 委 員
教授 佐 藤 寿 雄 教授 涌 井 昭

教授 鈴 木 磨 郎

論文内容要旨

〔目 的〕

膵癌の治療成績は不良であり、切除後の遠隔成績向上のためには術後早期の肝転移防止対策が必要である。そこで術中に門脈内に流入する癌細胞による肝転移形成を防止する目的で、ヒト膵癌培養細胞、ハムスター膵癌肝転移モデルを利用して、抗血小板剤による肝転移防止対策について検討した。

〔材 料〕

ヒト膵癌培養細胞は6株を用いた。ハムスター膵癌細胞はSyrian golden hamsterにN-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amineで誘発された膵癌から樹立された細胞株HPK-1細胞を用いた。HPK-1細胞は同系ハムスター皮下に移植すると中分化型腺癌から成る腫瘤を形成した。

〔方 法〕

ヒト膵癌細胞の血小板凝集能は正常人ヘパリン加血液より多血小板血漿（PRP）を作成し、それにヒト膵癌細胞浮遊液を加え、aggregometerにて凝集曲線を描出させた。血小板凝集抑制物質としてはprostaglandin（PG）のうちPGI₂、PGD₂、PGE₁の3種を用いた。PGによる血小板凝集抑制効果は、PRPにPGを加え5分間インキュベーション後、癌細胞浮遊液を加えた。ヒト膵癌細胞の凝固系への影響として、0.38%クエン酸加ヒト血漿を用いて、カルシウム再加時間を判定した。また、正常血漿のかわりに第Ⅷ因子欠乏血漿、第Ⅶ因子欠乏血漿を用いて同様の検討を行なった。ハムスター実験膵癌肝転移モデルの作成には、HPK-1細胞の皮下移植腫瘍を摘出し、collagenase、DNaseを用いて単細胞浮遊液を作成し、エーテル麻酔下にてハムスターを開腹し、門脈本幹より1×10⁶個の癌細胞を注入して作成した。PGによる肝転移抑制効果は、PGI₂、PGE₁をbufferに溶解し、癌細胞注入5分前に門脈内へ投与した。対照としてはPGを含まないbufferのみを投与した。各々のハムスターを癌細胞を投与してから2週後に屠殺し、肝表面の転移結節数を算定した。ハムスターの門脈内癌細胞およびPG投与後の血小板数の算定には一定時間毎に心臓採血し、位相差顕微鏡にて血小板数を算定した。血小板凝集能の化学的性質の分析には、コラゲナーゼ、フォスフォリパーゼA₂、ノイラミニダーゼ処理後の培養癌細胞を酵素未処理の対照群と血小板凝集の最大凝集で比較検討した。

〔 結 果 〕

検討した6株のヒト膀胱癌培養細胞中5株にヒト血小板凝集能を認めた。血小板凝集に必要な細胞数は $0.5 \times 10^7/ml$ の濃度であり、0～10分の lag time に続き解離傾向のない二次凝集がほとんどであった。血小板凝集はPGにより抑制され、 PGI_2 、 PGD_2 、 PGE_1 の順に強く抑制された。ヒト膀胱癌細胞の凝固系への影響では、5株に細胞濃度に比例してカルシウム再加時間が短縮しており、procoagulant 活性が認められた。第Ⅷ因子欠乏血漿を用いたものでは正常血漿とカルシウム再加時間に有意差を認めなかったが、第Ⅷ因子欠乏血漿を用いたときはカルシウム再加時間が延長しており、ヒト膀胱癌細胞はトロンボプラスチン様活性を有していると考えられた。血小板凝集能の化学的性質としてはヒト膀胱癌細胞ではシアル酸を含まない lipid をもつものが凝集に関与していることが示唆された。ハムスター膀胱癌細胞（HPK-1）にもハムスター血小板凝集能が認められ、またPGにより血小板凝集は抑制された。作成したハムスター膀胱癌肝転移モデルでは、門脈内注入癌細胞数が 1×10^6 個にて2週後の肝表面転移結節数は平均約62個であった。そこで、癌細胞注入前に PGI_2 、 PGE_1 を投与して肝転移抑制効果を検討したところ、 PGE_1 100 μg 群で肝表面転移結節数は平均33個と約50%の抑制効果が、また、 PGI_2 100 μg 群では平均11個と約80%の肝転移抑制効果が得られた。 PGE_2 100 μg 投与群と、 PGI_2 、 PGE_1 を癌細胞注入後に投与した群では肝転移抑制効果は得られなかった。また、対照群、PG投与群ともに、肺、腎、脾に転移結節を認めず、PG投与により肝通過後の臓器の転移が助長されることはなかった。癌細胞門脈内投与後のハムスター血小板数は注入癌細胞数に比例して減少したが、PG投与群では、血小板減少の程度は抑制されていた。

〔 結 論 〕

膀胱癌の切除後の遠隔成績不良の原因として術後早期の肝転移が第一にあげられる。癌の転移形成の着床過程において血小板の役割が重要視されていることから、抗血小板剤による肝転移抑制の目的からハムスター膀胱癌肝転移モデルを利用して抗転移作用を検討した。ヒト膀胱癌培養細胞、ハムスター膀胱癌細胞には血小板凝集能があり、抗血小板作用を有するPGにより抑制された。ハムスター膀胱癌肝転移モデルにおいてはPGによる肝転移抑制効果は明らかであり、これらの成績はin vivoにおける血小板減少の程度とほぼ一致していた。また、PG投与により肝通過後の転移が助長されることはなかった。以上の結果より、PGを用いた抗血小板療法は現在の膀胱癌に対する集学的治療の一部として、膀胱癌の肝転移を防止する有効な治療法となることが期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

各種診断技術の進歩により脾癌の診断能は向上しており、直径2 cm以下の小脾癌の発見率も高まっている。しかし、脾癌の切除率は20～30%と低く、小脾癌でさえも切除後は肝転移再発が多く、治療成績は不良である。脾癌は小脾癌といえども浸潤性増殖が強く、脈管侵襲とくに静脈侵襲が高率にみられる。教室の検討でも2 cm以下の小脾癌11例中9例に静脈侵襲が陽性であり、小脾癌の脾頭切除9例中8例、脾全摘術例全例に術後早期から肝転移がみられた。このことは脾癌の生物学的特性として把握され、術後早期の肝転移防止対策が急務であるが、ヒト脾癌の培養細胞株が少ないこともあって、脾癌の細胞生物学的特性から肝転移抑制対策を考慮したものはほとんどみられなかった。脾癌切除後の肝転移の機序に関しては種々考えられるが、本研究では脾癌切除標本の灌流液細胞診の結果より、術中に門脈内へ遊離する癌細胞の肝への着床阻害を血小板凝集能の面から検討した。

本研究は第1にヒト脾癌培養細胞、ハムスター脾癌細胞の血小板、凝固系に対する影響の検討、第2にハムスター実験脾癌の肝転移モデルの確立と抗血小板剤による肝転移抑制効果の検討、などによる細胞学的見地からの脾癌切除後の肝転移防止対策の探求である。

ヒト脾癌培養細胞株6株中5株、ハムスター脾癌細胞に血小板凝集能が認められ、さらにヒト脾癌細胞には凝固系に対する影響としてトロンボプラスチン様活性が認められた。

ハムスター実験脾癌は経門脈性に癌細胞を注入することにより細胞量に比例して肝転移結節数の増加がみられ肝転移モデルとして有用であった。さらにこの肝転移モデルを利用して抗血小板剤としてプロスタグランジン I_2 と E_1 を投与し、肝転移抑制効果を検討したところ、癌細胞注入前に抗血小板剤を投与すると有意に肝転移結節数の減少がみられた。癌細胞注入後に抗血小板剤を投与した群では肝転移抑制効果が得られなかったことより、抗血小板剤の肝転移抑制効果は癌細胞の肝への着床阻害によるものと思われた。また抗血小板剤投与によって肝通過後の肺転移などの増加はみられなかった。以上によりヒト脾癌細胞およびハムスター実験脾癌細胞には転移過程において重要な役割をもつ血小板凝集能が存在し、ハムスター脾癌肝転移モデルにおいて、抗血小板作用をもつプロスタグランジンの門脈内投与により肝転移が抑制されることが示された。本研究は脾癌の肝転移抑制法をヒト脾癌細胞を用い細胞生物学的にとらえ、ハムスター肝転移モデルを確立し、臨床応用を志向した抗血小板剤を門脈内に投与することにより肝転移抑制効果を検討したところに独創性が認められる。よって本論文は学位授与に値するものと認める。